

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2002-233393**

(43)Date of publication of application : **20.08.2002**

(51)Int.Cl.

C12P 7/64
// C12N 9/20

(21)Application number : **2001-030066**

(71)Applicant : **NATIONAL RESEARCH INST OF
BREWING**

(22)Date of filing : **06.02.2001**

(72)Inventor : **IEFUJI HARUYUKI
KAMINI N R
FUJII TSUTOMU
KUROSU TAKEYUKI
OKAZAKI NAOTO**

(54) METHOD FOR PRODUCING BIO-DIESEL FUEL (MONOALKYL ESTER)

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for efficiently producing a bio-diesel fuel (bio- diesel) that can be used in conventional petroleum-based diesel engines, can be recycled and scarcely pollutes.

SOLUTION: This method for producing the bio-diesel is characterized by the esterification reaction of a fat or fatty oil with a lipase originated from a Cryptococcus genus yeast (FERM P-15155) in the presence of the fat or fatty oil and an alcohol. Thereby, the reaction can not only efficiently be carried out at one step without sequentially adding the alcohol, but the bio-diesel can efficiently be produced even when an organic solvent or water is contained.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] **06.02.2001**

[Date of sending the examiner's decision of
rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-233393

(P2002-233393A)

(43) 公開日 平成14年8月20日 (2002.8.20)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース* (参考)
C 1 2 P 7/64		C 1 2 P 7/64	4 B 0 5 0
// C 1 2 N 9/20		C 1 2 N 9/20	4 B 0 6 4

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2001-30066 (P2001-30066)	(71) 出願人	301025634 独立行政法人 酒類総合研究所 広島県東広島市鏡山3丁目7番1号
(22) 出願日	平成13年2月6日 (2001.2.6)	(72) 発明者	家藤 治幸 広島県東広島市鏡山3丁目7番1号 国税 庁醸造研究所内
		(72) 発明者	カミニ・エヌ・アール 広島県東広島市鏡山3丁目7番1号 国税 庁醸造研究所内
		(74) 代理人	100075775 弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオディーゼル (モノアルキルエステル) の製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 油脂とアルコールの存在下、Cryptococcus属酵母 (FERM P-15155) 由来のリパーゼを用いて油脂のエステル化反応を行うこと、を特徴とするバイオディーゼルの製造方法。

【効果】 アルコールを逐次添加することなくワンステップで効率的に反応が行われるだけでなく、有機溶媒や水分の混在下でも効率的にバイオディーゼルを製造することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 油脂とアルコールの存在下、リパーゼを用いて、一段階で油脂のエステル化反応を行うこと、を特徴とするバイオディーゼルの製造方法。

【請求項2】 油脂とアルコールの存在下、リパーゼを用いて、水分の混在にもかかわらず油脂のエステル化反応を行うこと、を特徴とするバイオディーゼルの製造方法。

【請求項3】 油脂とアルコールの存在下、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属酵母由来のリパーゼを用いて油脂のエステル化反応を行うこと、を特徴とするバイオディーゼルの製造方法。

【請求項4】 クリプトコッカス属酵母がクリプトコッカス エスピー・S-2 (Cryptococcus sp. S-2) (FERM P-15155) であること、を特徴とする請求項3に記載のバイオディーゼルの製造方法。

【請求項5】 下記の理化学的性質を有するリパーゼCS2を用いること、を特徴とするバイオディーゼルの製造方法。

(1) 作用

油脂分解性を有し、トリグリセリドに作用して、グリセリンと脂肪酸に加水分解する。油脂とアルコールの存在下、油脂のエステル化反応を触媒する。

(2) 基質特異性

トリブチリン、トリカプリリン、トリパルミチン、トリオレインをよく分解する。

(3) 位置特異性

トリオレインに作用せしめると、オレイン酸と少量の1, 2 (2, 3) -ジオレインが生成し、1, 3-ジオレインとモノオレインは検出されない。

(4) 至適pH及び安定pH範囲

至適pH: 7. 0

安定pH範囲: 5~9

(5) 反応最適温度及び温度による失活の条件

反応最適温度: 37℃

温度による失活の条件: 温度上昇による活性の失活は緩やかであり、60℃、30分の熱処理においても活性を維持している。

(6) 有機溶媒に対する安定性、活性化

有機溶媒に安定であり、更に、ジメチルスルホキシド、ジエチルエーテルによって活性が上昇する。

【請求項6】 油脂として植物油を用いること、を特徴とする請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 植物油として米糠油を用いること、を特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】 油脂として、廃油又は有機溶媒が混在する油脂を使用すること、を特徴とする請求項1~7のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、石油ベースのディーゼル燃料と同じエンジンが使用可能であり、再生産可能にして公害の少ないバイオディーゼル燃料（以下、単にバイオディーゼルということもある）の効率的製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】今日、ディーゼルエンジン車の放出する微粒子、硫黄酸化物、窒素酸化物、一酸化炭素による大気汚染の深刻化に伴い、公害の少ない、きれいなガスを放出する代替燃料が求められるようになった。一方、石油などの化石燃料の枯渇によるエネルギー危機が近い将来に起こることが確実視されており、植物油のような、天然の再生産可能な原料（バイオマス）から作られる燃料の生産が重要な課題となっている。

【0003】そうした状況の中、石油ベースのディーゼル燃料と同じエンジンが使用でき、排ガス放出量を大幅に削減することができる、再生産可能なバイオディーゼルが注目されてきた。

【0004】バイオディーゼルは、動植物油脂のアルコールシス（メタノリシス）によって生成する脂肪酸のメチルエステル（ME）に代表されるように、油脂中のグリセロールとアルコールとをエステル交換して得られるアルキルエステルを指称するものである。

【0005】現在、このバイオディーゼルの多くは化学的な合成により生産されているが、反応後の触媒除去、副産物グリセロール回収の困難さ、またその製造工程に多量のエネルギーを必要とすることなど、多くの問題をかかえている。

【0006】そこで、リパーゼ酵素を利用したバイオディーゼルの生産が注目されるようになった。通常、リパーゼは、油脂（トリグリセリド）を脂肪酸とグリセロールへ加水分解する反応を触媒するが、水分が制限された条件では、脂肪酸とアルコールをエステル結合させる逆反応を行わせることが可能である。さらに、トリグリセリドをメタノールなどの低級アルコールと共存させ、それにリパーゼを作用させることで、トリグリセリド中のグリセロールとメタノールなど低級アルコールをエステル交換させる方法も可能である。

【0007】トリグリセリド1分子は、3つの脂肪酸と1つのグリセロールからなることより、トリグリセリド1モルを完全にバイオディーゼル（モノアルキルエステル）とするには理論的に3モルの低級アルコールが必要である。

【0008】しかし、今まで試みられてきたリパーゼを用いたバイオディーゼル生産では、主にトリグリセリド1モルに対し、まず1モルの低級アルコールを加えてエステル化させ、その反応がほぼ終了した時点でさらに2モルのアルコールを1モルずつ順次加えていくなど多段階仕込みにより行われてきた。これは一般に用いるリパーゼが低級アルコールで活性を失いやすいことより、1

回に添加するアルコールの量を抑えながら順次追加して行こうとするものである。また、既知のリパーゼでは、水分含量が高い系、ヘキサンや石油エーテル等有機溶媒が存在する系においては、エステル化反応が妨害される、という工業化において特に問題となる欠点があった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記した欠点のない効率的なバイオディーゼル（モノアルキルエステル）の製造方法を新たに開発する目的でなされたものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するため各種検討の結果、バイオディーゼルの製造において、化学合成法よりもマイルドな酵素法に着目し、多数の酵母を自然界から分離し、その性質についての研究の過程において、クリプトコッカス エスピー・S-2が、 α -アミラーゼ、キシラナーゼ等の酵素のほか、多量のリパーゼを生産分泌し、その酵素は中性からアルカリ性で強い油脂分解性を示すこと、さらに、本酵素は、ジエチルエーテル、クロロホルム、ヘキサンなどの有機溶媒に安定であり、しかもトリグリセリドとメタノールとの共存下においてトリグリセリド中のグリセロールとメタノールをエステル交換し、脂肪酸のメチルエステルを生成すること、換言すれば油脂のメチルエステル化、つまりバイオディーゼルの生成することをはじめ

て見出した。

【0011】本発明は、上記新知見に基づいてなされたものであって、本酵素の理化学的性質を研究して本酵素が従来未知の新規酵素であることを確認しただけでなく、バイオディーゼルの製造にも成功し、遂に本発明を完成したものである。以下、本発明について詳述する。

【0012】本発明は、油脂（トリグリセリド）とアルコールの存在下、リパーゼを作用させることによりエステル化反応を効率的に行い、もってバイオディーゼルの製造する点を基本的技術思想とするものであって、リパーゼとしては、エステル交換反応を一段階で実施することができ、及び／又は、多量の水分の存在下でもエステル交換反応を実施できるものであればどのようなリパーゼを使用することも可能である。このようなリパーゼとしては、クリプトコッカス属由来のリパーゼが例示され、その理化学的性質は次のとおりである。

【0013】（１）作用

油脂分解性にすぐれ、トリグリセリドに作用して、グリセリンと脂肪酸に加水分解する。トリグリセリド中のグリセリンとアルコールをエステル交換する、換言すれば油脂のモノアルキルエステル化を触媒する。

【0014】（２）基質特異性

各脂肪酸のトリグリセリド及びオイルに対する基質特異性は、下記表１に示すとおりである。

【0015】

(表１)

第１表：各種トリグリセリド及びオイルに対するリパーゼの基質特異性

基 質	*比活性 (%)
トリアセチンC ₂	50.2
トリブチリンC ₄	225.4
トリカプリリンC ₈	269.0
トリカプリンC ₁₀	56.3
トリラウリンC ₂	56.3
トリミリスチンC ₁₄	12.7
トリパルミチンC ₁₆	125.4
トリステアリンC ₁₈	18.8
トリオレインC _{18:1}	100.0
オリーブ油	56.2
大豆油	60.1
米糠油	80.2
イワシ油	76.0
ココナツ油	52.0
鯨油	32.1

*各基質の比活性はトリオレインに対する比活性を100としたときの%で示した。

【0016】本酵素は、トリグリセリドの内、トリブチリン、トリカプリリン、トリパルミチン、トリオレイン

ンを効率よく分解する。一方トリアセチン、トリカブリン、トリラウリンは中程度、トリミリスチン、トリステアリンに対しては分解力が弱かった。本酵素は、テストした全てのオイルに対し良好な分解活性を示し、特に米糠油、イワシ油をよく分解した。

【0017】(3) 位置特異性

本酵素がトリオレインに作用する際の、分解の位置特異性を調べた。酵素反応により、オレイン酸と少量の1, 2(2, 3)-ジオレインが生成し、1, 3-ジオレインとモノオレインは検出されなかった。

【0018】(4) 至適pH及び安定pH範囲

精製酵素の反応至適pHは7.0であった。pH8.0においても高い活性を示した。またpHの安定性ではpH5からpH9において安定であり、弱酸性から弱アルカリ性まで広い範囲で機能するリパーゼであった。

(表2)

第2表：リパーゼ活性に及ぼす有機溶媒添加の影響

溶 媒	*比活性 (%)				
	0	2.5	5.0	7.5	10.0
アセトン	100	92.2	83.3	23.0	9.0
ベンゼン	100	68.6	59.7	5.3	-
クロロホルム	100	80.4	74.8	60.4	54.5
ジエチルエーテル	100	100	116.7	113.2	100.6
DMF	100	92.6	92.4	66.8	36.3
DMSO	100	108.3	121.4	164.2	124.4
ヘキサン	100	96.9	95.2	90.9	74.4
ピリジン	100	85.3	62.9	35.6	12.8
トルエン	100	80.9	71.1	55.1	34.6

*比活性 (%) は、各種溶媒濃度 (%、v/v) における比活性を示す。

【0022】このように、本リパーゼが有機溶媒に安定であることは特記すべきことである。リパーゼによるエステル交換反応やエステル合成は、有機溶媒とわずかな水の混在する系によりはじめてその反応が進行するが、一般にリパーゼはそのような有機溶媒と水の混在する系では不安定であることが問題であった。

【0023】ところが本リパーゼは、ジエチルエーテル、クロロホルム、ヘキサンの存在によっても50%以上の活性と安定性を示し、有機溶媒の存在下においても、エステル交換反応やエステル合成が可能であり、したがって油脂の抽出の際に抽出溶媒として使用された有機溶媒が残存する粗製油脂からも(精製することなく)バイオディーゼルを製造することができ、また、多量の水の存在下でも本酵素は十分に活性を保持しており、これらの点からして、本酵素はバイオディーゼルの新規製造、特に工業的効率的製造の面から、きわめてすぐれている。

【0019】(5) 反応最適温度及び温度による失活の条件

反応最適温度は37℃であった。しかし温度上昇による活性の失活は緩やかであり、60℃、30分の熱処理においても71%の活性を維持していた。

【0020】(6) 阻害、活性化及び安定化

種々の有機溶媒を0、2.5、5.0、7.5、10.0%の濃度で添加し、リパーゼの活性に与える効果を調査し、下記表2の結果を得た。その結果、本リパーゼは、ベンゼンを除く各種有機溶媒に安定であり、DMSO(dimethylsulfoxide)、ジエチルエーテルによってむしろ活性の上昇がみられ、DMSO7.5%の状態において64.2%の活性上昇が見られた。

【0021】

【0024】(7) リパーゼ活性の測定法

リパーゼ活性は、p-nitrophenyl laurate (p-NPL)を反応基質とした410nmの吸光度法にて測定した。また必要に応じ、オリーブオイルを基質とした滴定法にてリパーゼ活性を測定した。

【0025】(8) 分子量

22kDa (SDS-PAGE)

【0026】本酵素は、上記した理化学的性質からみて、従来既知のリパーゼにはこのようなタイプの酵素は見当らず、新規物質と認定し、これをリパーゼCS2と命名した(なお、これをCS2リパーゼということもある)。

【0027】本発明に係る新規酵素は、微生物、例えばクリプトコッカス属に属するS-2株(FERM P-15155)(以下、CS2株ということもある)の培養物から分離、取得することができる。ここに創製分離された菌株は、新規酵素(リパーゼCS2)を生産分泌

できる点できわめて特徴的であり、これをクリプトコッカス エスピー・S-2 (*Cryptococcus* sp. S-2) と命名し、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所にFERM P-15155として寄託した。

【0028】本酵素は、CS2株を常法にしたがって培養し、培養物から抽出し、精製することにより取得することができる。例えば、YM培地（酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.5%、ペプトン0.5%、グルコース1%）にて25℃、40時間前培養（5.4～5.8×10⁸ケ／ml）した菌体を通常の本培養への接種菌とする。

【0029】酵母エキス0.5%、KH₂PO₄1%、MgSO₄・7H₂O 1%、トリオレイン1%を基本とし、必要に応じ、窒素、炭素源、そして誘導物質を変化させたものを酵素生産培地とした。100mlの酵素生産培地に、前培養した菌を1% (v/v) 接種し、25℃100rpmの振とう培養にて、酵素の生産を行えばよい。トリオレインは添加しなくてもよいが、*Cryptococcus* sp. S-2によるリパーゼの生産はオリーブオイル、トリオレインなどの油脂を炭素源にすることでグルコース培地より約3倍のリパーゼ活性の分泌が見られ、油脂を炭素源にすることでリパーゼの生産は優位に高められる。油脂としては、上記のほかにイワシ油、大豆油、トリグリセリドから選ばれる少なくともひとつを使用すると好適である。

【0030】CS2株の培養は、酵母の培養と同様に実施すればよいが、上記のように炭素源として油脂を使用すると酵素の生産が上昇する。また、窒素源として酵母エキス、糖としてラクトースを使用しても、酵素の生産が上昇する。

【0031】CS2株を培養した後、本酵素を培養物から分離、精製する。その方法は常法にしたがえばよいが、例えば培養液を濃縮した後、クロマトグラフィー処理等既知の精製法を組み合わせればよい。また、本酵素は、高度に精製することは必ずしも必要ではなく、例えば培養上清を限外ろ過して得た濃縮液をバイオディーゼルの製造に使用することが十分に可能である。

【0032】このようにして得られた本酵素（CS2リパーゼ）は、上記した特質を有するため、有機溶媒や多量の水分の存在下においてもエステル交換反応やエステル合成反応を触媒することができ、バイオディーゼル燃料の製造、特に工業的製造に利用できるだけでなく、油脂の加水分解という通常のリパーゼが有する性質も併有しており、医薬、化粧品、飲食品、洗剤、試薬その他の用途に広範に利用できることはもちろんのことである。

【0033】本発明を実施するには、油脂とアルコールの存在下において、リパーゼにより、油脂中のグリセロールとアルコールをエステル交換すればよく、例えば、油脂、アルコール、リパーゼを、必要あれば攪拌しながら、混合して反応させればよく、しかも、上記したよう

なりリパーゼを使用すれば、アルコールを逐次添加する必要はなく、ワンステップで反応が行われるし、その際有機溶媒中や大量の水分が混在しても反応がスムーズに進行するという著効が奏される。

【0034】このように、本発明は酵母*Cryptococcus* sp. S-2の生産するリパーゼを使用することで、トリグリセリド1モルに対し、最初から3モルおよびそれ以上の低級アルコールを加えて反応させ、リパーゼによるバイオディーゼルの生産工程を単純化することを可能にしたものであって、アルコールを逐次添加する必要はなく、工業上非常に卓越したものである。

【0035】また一般にリパーゼは、水の多い状態では本来のトリグリセリドを加水分解する反応を起こし、その逆反応であるエステル化は水を厳しく制限した状態により初めてその反応が主となるものである。しかるに*Cryptococcus* sp. S-2の生産するリパーゼは、通常のリパーゼではエステル化の妨げられる水分含量においてもその反応が進行していくという優れた性質を持つ。エステル化反応では必然的に水が生じ、この生成水の蓄積によりリパーゼによるエステル化反応は妨げられることになるが、*Cryptococcus* sp. S-2リパーゼではそうした妨害はない。

【0036】また日本でバイオディーゼルの原料として好んで使われる家庭からの廃油などには水分を多く含むものも多いが、*Cryptococcus* sp. S-2リパーゼはこうした油脂においてもあまりその水分を気にすることなくバイオディーゼルの原料として用いることができる。

【0037】*Cryptococcus* sp. S-2リパーゼは、各種動植物油の中でも米糠油に対して特に高いエステル生産性を示す。米糠油は米の糠から得られる安価な油であり、我が国で豊富に生産できるものである。*Cryptococcus* sp. S-2リパーゼが米糠油に対して特に効率よくバイオディーゼルが生産できることは、米糠の有効利用に役立つものである。

【0038】通常のリパーゼはヘキサン、石油エーテルの存在でその活性低下がみられるが、*Cryptococcus* sp. S-2リパーゼはこれら有機溶媒の混在で逆にその活性の上昇がみられる。*Cryptococcus* sp. S-2リパーゼではトリグリセリドと低級アルコールのエステル化反応においてヘキサン、石油エーテルの混在でエステル化効率が向上するが、このことは米糠などから油脂を抽出する際に使用されるヘキサンや石油エーテルを完全に除去しない粗精製油脂を原料にすることでかえって効率よくバイオディーゼルの生産が可能であることを示すものであり、コストおよび生産工程上極めて有利な点である。

【0039】本発明の実施態様としては、下記の態様が例示される。

(1) リパーゼを使用した一段階でのバイオディーゼル製造法。

(2) 水分含量の多い状態でのリパーゼによるバイオデ

イーゼルの製造。

(3) 酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 のリパーゼを使用したバイオディーゼル製造方法。

(4) 米糠油からのバイオディーゼル製造。

(5) ヘキサン、石油エーテルのほか既述した各種有機溶媒の混和する粗製油脂からのバイオディーゼル製造。

【0040】リパーゼを作用させる油脂としては、動物（魚類を含む）及び植物由来の油脂の1種又は2種以上がすべて使用可能であり、非限定例としては次のものが例示される。オリーブ油、菜種油、大豆油、米糠油、クルミ油、ゴマ油、ツバキ油、ピーナッツ油等の植物油。バター、豚脂、牛脂、羊脂、鳥脂、鶏油等の動物油。クジラ油、イワシ油、ニシン油、タラ肝油等の魚油。

【0041】本発明において油脂のアルキルエステル化反応は有機溶媒や大量の水分の存在によって妨害を受けないので、油脂は精製されたものでなくても使用可能であり、これらを含む、付随してなる油脂、これらと油脂との混合物も使用可能である。したがって、固形油脂も溶媒に溶解して使用することができる。また、本発明方法は有機溶媒や水分の影響を受けないことから、どのような方法によって製造した油脂も適宜使用することが可能であって、例えば圧搾法、抽出法、溶出法等で製造した油脂が格別の精製工程を経ることなく適宜使用できる。

【0042】アルコールとしては、メタノール等の低級アルコールのほか各種のアルコールが適宜使用可能であって、その非限定例としては次のものが挙げられる：メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコール、イソブチルアルコール、s-ブチルアルコール、t-ブチルアルコール、アミルアルコール、ヘキシルアルコール等脂肪族アルコール；アリルアルコール、プロパルギルアルコール等の不飽和脂肪族アルコール；シクロヘキサノール、シクロペンタノール等の脂環式アルコール；ベンジルアルコール、シンナミルアルコール等の芳香族アルコール；その他の各種アルコール。

【0043】本発明を実施するには、油脂、アルコール、リパーゼを混合、インキュベートすればよく、しかも反応系に水分や有機溶媒が混在していても反応が特に阻害されることがなく、それどころかエステル化率が上昇する場合があることも確認されたところから、反応条件に格別の制限はなく、広範囲に適宜設定すればよいが、特に好適な反応条件は次のとおりである。

【0044】酵素量は300～5000 U、好ましくは500～3000 U、更に好ましくは1500～2500 Uであり、基質重量に対して水の量が5～500 wt %存在しても反応は阻害されず、それどころか水分60～100 wt %の存在下ではエステル量の増加が認められ、アルコール量を油脂に対して1：1～1：4の比率で使用した場合、水分量が少ない場合（例えば50%以

下の場合）、アルコール量の比率が低い方がエステル化率は高く、水分量が多い場合（例えば50%以上の場合）、アルコールの比率が高い方がエステル化率が高いことが認められた。

【0045】更に反応条件に関しては、pH 5～9、温度25～40℃においては格別の反応阻害は認められず、反応pH及び反応温度は広範囲に選択することが可能である。反応時間も目的とするエステル化率が達成されるまで反応を継続する等適宜選択の域内であるが、一応の目安として50～200時間程度で所期の目的が達成される。なお、反応は、50～300 rpm程度で攪拌しながら行うのがよい。

【0046】また、本発明方法は、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ジエチルエーテル、n-ヘキサン、石油エーテル、ベンゼンその他油脂抽出用有機溶媒のほか既述したような各種有機溶媒の存在によっても反応が阻害されないという特徴も有するものであって、30%以下の場合には反応阻害が認められなかった。それどころか逆に、有機溶媒の種類によっては、例えばDMSO、n-ヘキサン、石油エーテルを5～15%添加した場合にはエステル化率の上昇が認められたことから、有機溶媒の添加によってエステル化率を高めることすら可能である。以下、本発明の実施例について述べる。

【0047】

【実施例1】酵母エキス 0.5%、ラクトース 0.5%、 KH_2PO_4 1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1%、トリオレイン 1%からなるリパーゼ生産用培地に前培養したCS2菌（FERM P-15155）を1%（v/v）接種し、初期pH 5.6、25℃、100 rpmで120時間振とう培養した。

【0048】酵素の精製は次のようにして行った。酵母細胞を除いた培養液を8,000 rpm、10 min遠心分離し、0.45 μm のメンブランフィルターにて濾過後、限外濾過により濃縮した。陽イオン交換樹脂TSK-gel SP-5PWカラムによる高速液体クロマトグラフィ（pH 7.0リン酸バッファ、およびそれに0.5% NaCl添加したものによるグラジエント溶出）によってリパーゼを精製した。活性は17.1倍、収量は11.4%であった。SDS-PAGE上で単バンドとなり、分子量はDSS-PAGEにより22 kダルトンであることが判明した。得られた酵素（CS2リパーゼ）の理化学的性質は、既述のとおりであった。

【0049】

【実施例2】酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 をリパーゼ生産用培地（実施例1）で120時間、25℃培養、得られた培養液を8,000 rpmで20分遠心し、遠心上清をアミコン社の10,000分子量カット限外ろ過膜（YM-10）にて濃縮し、酵素液を得た。

【0050】

【実施例3】A：CS2リパーゼを用い、油脂とメタノ

ールを反応させて油脂のメチルエステル化（メタノリシス）を行った。

【0051】（１）リパーゼ活性

リパーゼ活性は、p-ニトロフェニル・ラウリン酸（p-NPL）を基質とした分光光度法により測定した。標準的な活性測定法のもとで、1マイクロモルのp-ニトロフェノールを生成する酵素を酵素活性1ユニットとした。

【0052】（２）メチルエステル化

油とメタノール9.65g/0.35g（mol/mol=1/1）の混合物を初期基質とした。これに500UのCS2リパーゼを含む4ml酵素液を100mlの共栓付き三角フラスコ内で加えて反応混合物とし、30℃、96時間、160rpmにて振とうすることで反応を行った。24時間ごとに試料を分取し、キャピラリーガスクロマトグラフにより、以下のように分析した。

【0053】（３）反応最適化研究

酵素量を500～2,500U、基質重量に対する水の量を13～200wt%、メタノール量を油に対して1:1～1:4の範囲で変動させ反応条件を検討した。さらにpH5～9、温度25～40℃にて反応条件を検討した。また種々有機溶媒添加（10%、w/v）の影響についても調べた。

【0054】（４）キャピラリーガスクロマトグラフ分析

一定時間毎に反応液より300マイクロリットルの試料

（表1）

表1：各種植物油のクリプトコッカス エスピー、S-2由来のリパーゼによるエステル化（a）

油 脂	エステル変換率（%）（b）			
	24時間	48時間	72時間	96時間
オリーブ油	7.5	9.7	12.5	16.7
菜種油	9.4	14.3	17.6	21.1
米糠油	9.8	16.6	20.2	24.9
大豆油	9.6	12.9	16.9	21.1

（a）反応は、9.65g油脂と0.35gメタノール（1:1、モル/モル）にリパーゼ500Uを含む4mlの水を添加し、行った。

（b）エステル化率は、基質として用いた油脂に対するメチルエステル化の比率として表わした。

【0058】（１）酵素量の（米糠油メチルエステル化に及ぼす）影響

次に、リパーゼ添加量を500U～2,000Uの範囲で反応を行った。結果は図1のように、酵素量の増加に伴いエステル化率は向上し、2,000Uにより33%のエステル化率を示した。これは1分子内で3モルの脂

を独立して3回分取し、遠心後、その上清を得た。15mlの試験管のなかで、100マイクロリットル上清に60マイクロリットルのトリカブリンを内部標準、無水硫酸ナトリウムを脱水剤として、3.0mlのヘキサンを添加し、よく攪拌混合した。それより1.0マイクロリットルの試料を取り、DB-5キャピラリーカラム（0.25mm×15m; J & W Scientific, Forsom, CA, USA）によるガスクロマトグラム（島津製、GC-17A）にて反応物中のME（メチルエステル）、FFA（遊離脂肪酸量）を測定した。インジェクターおよびディテクターの温度はそれぞれ245および250℃。カラムは150℃にて0.5分保持した後、210℃まで5℃/min、それ以降300℃まで10℃/minの条件で昇温した。

【0055】B：実施例2で得た酵母クリプトコッカス エスピー、S-2由来の粗精製物をリパーゼとして用い、植物油のメチルエステルを行った。

【0056】本リパーゼを用いオリーブ油、菜種油、米糠油、大豆油、それぞれとメタノールのエステル化反応を調べた結果を表1に示す。反応条件は実験方法参照。30℃、96時間の反応で米糠油が24.9%のエステル化率を示し、最も良好な結果を示した。このことより以降の実験は米糠油を基質油として使用することとした。

【0057】

脂肪酸を有する油脂に対し、1モルのメタノールを添加した際に得られるエステル率の最大限の値に相当する（図1）。

【0059】（２）水分の（米糠油メチルエステル化に及ぼす）影響

水分含量13%、48時間の条件で、メチルエステル含量（ME）は31.5%であり、反応液中の94.6%メタノールが消費されていた。水分が30および50%に増えるに伴い、48時間目でのエステル生成量は8.9および16.5%に減少したが、しかし表2に示すように96時間後においてはその生成量にほとんど差はな

くなった。一方、水分13%及び50%での96時間後の遊離脂肪酸はそれぞれ24.0、42.1%と水分の
(表2)

表2：水分含量のエステル化および脂肪酸生成に及ぼす影響 (a)

水分含量 (重量%)	メチルエステル含量(重量%)				脂肪酸含量(重量%)			
	24時間	48時間	72時間	96時間	24時間	48時間	72時間	96時間
13	16.4	31.5	33.3	34.0	4.7	10.3	19.9	24.0
20	22.6	31.4	33.5	34.0	12.5	21.1	30.5	33.3
30	23.0	28.7	32.4	33.3	13.5	24.2	32.4	35.4
40	23.1	26.6	30.1	33.3	18.7	31.5	38.0	40.0
50	22.5	26.3	28.5	32.4	22.5	35.4	39.1	42.1

(a) 油9.65gとメタノール0.35g(1:1、モル/モル)の混合物、及び、リパーゼ2000Uを含む酵素液として各種水分含量(1.3~5.0ml=13~50基質重量%)からなる反応系で、反応を行った。

【0061】(3) 水分含量とメタノール添加量の(米糠油メチルエステル化に及ぼす)影響

油脂を完全に脂肪酸エステルに変換するには少なくとも3モルのメタノールが必要である。しかしながら、例えば*Rhizopus oryzae*のリパーゼでは1モル以上のメタノールを含む反応系では酵素の不活性化が起きることより、エステル化反応では1モルずつのメタノールを順次追加してゆく方法を取る必要がある。

【0062】しかし、もし使用するリパーゼがメタノールを多くした時においても不活性化しないなら、最初からメタノール量を多くし、その添加回数を減らせた方が操作が簡単となる。そこで油脂とメタノールの比率を1:1から1:4、また水の含量を基質重量に対して20から200%、それぞれ最初に一度に添加するワンステップ法により反応を行った。結果は図2に示すように、メタノール比が増加(1:1~1:4)するに伴い、そして水分含量60~100%範囲で増加するに伴い、メチルエステル量は増加した(図2)。

【0063】以上のことより*Cryptococcus* sp. S-2リパーゼでは最初から一度に多くのメタノールを添加して反応させることが可能であることが確認された。また、*Pseudomonas fluorescens*や*Mucor miehei*などの一般のリパーゼでは、反応液中に水分が加わるとエステル変換率の低下をまねくが、本リパーゼではある程度の量の水分が存在する方が変換率が良い、という反対の効果が観察された。

【0064】(4) pHおよび温度の影響
基質の対する添加水分80%の条件で、pHのエステル化反応に与える影響を調べた。結果を図3に示すが、調べたpH5から9の範囲において、pHが上がるにつれ

多い方が増大する傾向が見られた。
【0060】

反応は低下した。しかし結果としてpH調整をしないものの方が最も高いエステル変換を示した。これはpH調整に使用する塩の存在が酵素反応に阻害的に働くことによると思われる。結果としてpH調整は特にする必要がないことが示された(図3)。

【0065】温度の影響を図4に示す。25、30、35、40℃のなかで短時間(24時間)では温度の低い方がより良好であるが、96時間では30℃がわずかわかり高い結果を得た(図4)。

【0066】(5) メタノール比

1モルの油脂は3モルの脂肪酸と1モルのグリセロールより構成されることから、理論的には油脂の完全なエステル化には3モルのアルコールが要求される。合成化学反応での油脂のエステル化では、エステル化効率を上げるため油脂1モルに対してアルコール6モルを使用する反応系も取られている。そこで酵素を使用した我々の反応系においても、油脂とアルコール比を1:2から1:6の範囲で変化させ、反応を行った。結果を図5に示すが、1:3の時に比べ、1:4において11.8%のエステル化率上昇(120時間目)がみられた。1:5では1:4以上の効果は見られず、1:6では減少した(図5)

【0067】以上の結果を総合して、油脂とメタノールの比を1:4、水分を基質の80%、リパーゼ活性2,000U、120時間、30℃の条件が最良の条件の1例であることを見出した。

【0068】(6) 有機溶媒の添加効果

DMSO、ジエチルエーテル、n-ヘキサン、石油エーテルを各10%量添加し、有機溶媒のエステル化反応に及ぼす影響を見た。結果を表3に示す。DMSO、n-ヘキサン、石油エーテルを添加することで4.8%から7.0%のエステル化率上昇が見られた。このことは、植物から油脂を抽出するときにn-ヘキサンなどの有機溶媒が使われるが、それら有機溶媒をいくらか含有する安価な粗精製油脂を原料とすることで、むしろ高い効率

でエステルが得られるメリットが得られる。

【0069】(表3)

表3：エステルに及ぼす有機溶媒
(10%, w/v)の影響(a)

有機溶媒	ME含有量(重量%)
無添加(b)	80.2
DMSO	85.0
ジエチルエーテル	70.4
n-ヘキサン	86.1
石油エーテル	87.2

(a) 油9.65g/メタノール1.4g(1:4、モル/モル)混合物、水8.84ml(リパーゼ2000U含有)、及び溶剤の存在下、30℃で120時間、反応を行った。

(b) 溶剤の使用をとりやめたほかは、上記と同一反応条件で、反応を行った。

【0070】

【発明の効果】本発明により、きわめて効率的にわずか1工程でバイオディーゼル燃料を製造することが可能となった。また本発明によれば、反応系に有機溶剤や多量の水分が混在していても油脂のエステル化がスムーズに進行することから、廃食用油等廃油又はその混合物もバイオディーゼル化することが可能となり、これらを河川等に廃棄する必要がなくなり、廃液処理法として、環境保全の面からも本発明は卓越している。

【図面の簡単な説明】

【図1】米糠油のメタノリシスに及ぼす酵素量の影響を示す。

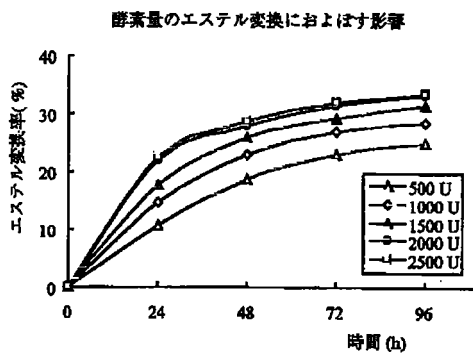
【図2】米糠油のメタノリシスに及ぼす水分含量とメタノール濃度の累加的影響を示す。

【図3】米糠油のメタノリシスに及ぼすpHの影響を示す。

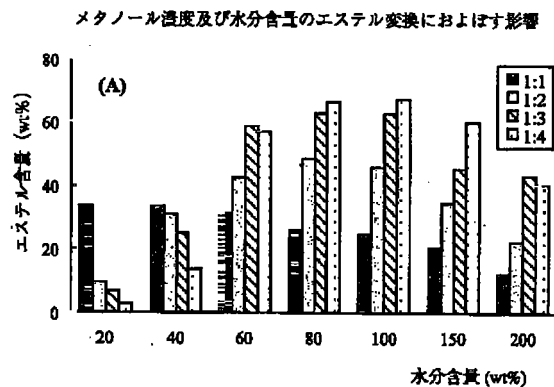
【図4】メチルエステル化反応に及ぼす温度の影響を示す。

【図5】米糠油のメタノリシスに及ぼすメタノールとのモル比の影響を示す。

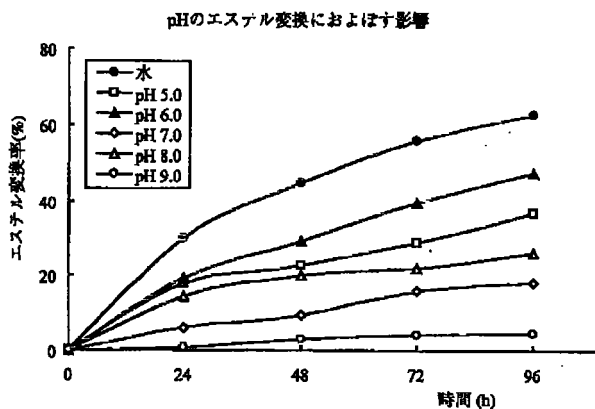
【図1】



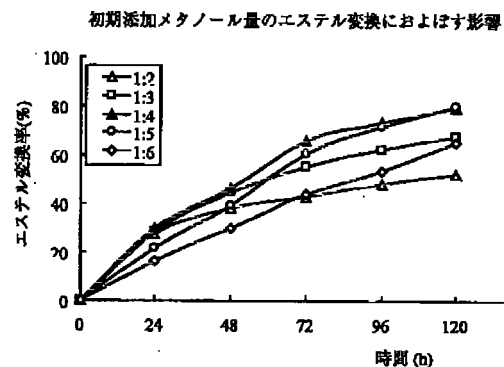
【図2】



【図3】

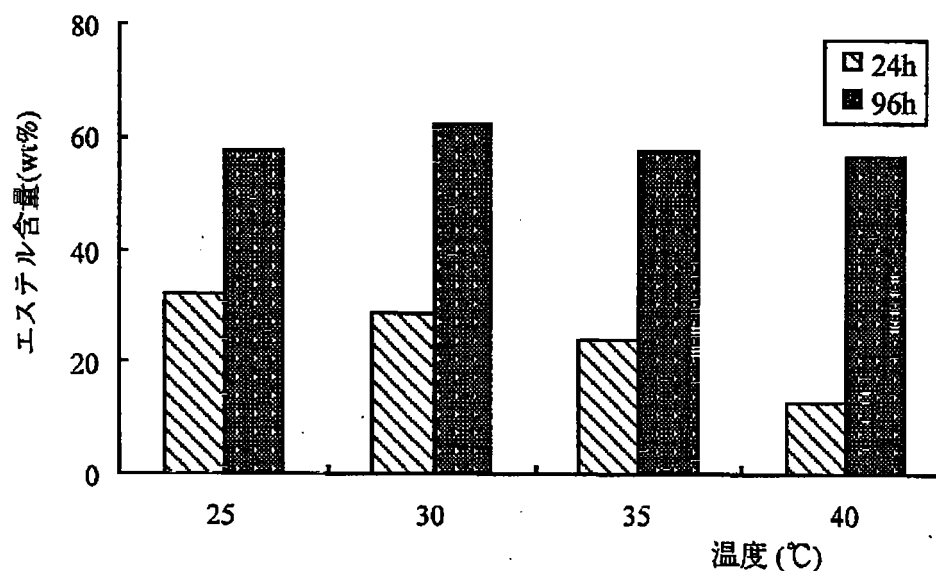


【図5】



【図4】

温度のエステル変換におよぼす影響



フロントページの続き

(72)発明者 藤井 力
広島県東広島市鏡山3丁目7番1号 国税
庁醸造研究所内

(72)発明者 黒須 猛行
広島県東広島市鏡山3丁目7番1号 国税
庁醸造研究所内

(72)発明者 岡崎 直人
広島県東広島市鏡山3丁目7番1号 国税
庁醸造研究所内

Fターム(参考) 4B050 CC01 DD04 FF05E LL05
LL10
4B064 AD85 CA21 CB30 CC03 CD06
CD07 CD30 DA20